

POLYCLONAL ANTIBODIES, PREPARATION METHOD THEREOF AND USE OF SAME

Publication number: ES2201929

Publication date: 2004-03-16

Inventor: SARASA BARRIO MANUEL (ES); SORRIBAS ALEJALDRE VICTOR (ES)

Applicant: UNIV DE ZARAGOZA Y EN SU NOMBR (ES)

Classification:

- **International:** C07K14/47; C07K16/18; G01N33/68; C07K14/435;
C07K16/18; G01N33/68; (IPC1-7): C07K16/18;
C07K7/06; C07K7/08; G01N33/68

- **European:** C07K14/47A3; C07K16/18; G01N33/68V2

Application number: ES20020002094 20020912

Priority number(s): ES20020002094 20020912

Also published as:



EP1550673 (A1)
WO2004024770 (A1)
AU2003260513 (A1)

[Report a data error here](#)

Abstract not available for ES2201929

Abstract of corresponding document: EP1550673

Polyclonal antibodies, preparation method thereof and use of same. The invention relates to polyclonal antibodies which specifically recognize, and have a strong affinity with, the two most significant amyloid peptides, A beta 40 and A beta 42. The invention also relates to the use thereof in assessing drugs which activate the degradation of amyloid peptides characteristic of Alzheimer's disease as well as drugs which inhibit the formation of same.

Data supplied from the esp@cenet database - Worldwide



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS
ESPAÑA



⑪ Número de publicación: 2 201 929

⑫ Número de solicitud: 200202094

⑬ Int. Cl.⁷: C07K 16/18

C07K 7/06

C07K 7/08

G01N 33/68

⑭

SOLICITUD DE PATENTE

A1

⑮ Fecha de presentación: 12.09.2002

⑯ Solicitante/s: Universidad de Zaragoza (O.T.R.I)
Baltasar Gracián 1, Entlo
50005 Zaragoza, ES

⑰ Fecha de publicación de la solicitud: 16.03.2004

⑰ Inventor/es: Sarasa Barrio, Manuel y
Sorribas Alejaldre, Víctor

⑲ Fecha de publicación del folleto de la solicitud:
16.03.2004

⑳ Agente: No consta

㉑ Título: Anticuerpos policlonales, método de preparación y uso de los mismos.

㉒ Resumen:

Anticuerpos policlonales, método de preparación y uso de los mismos.

Anticuerpos policlonales que reconocen específicamente y con gran afinidad a los péptidos amiloideos más importantes, el A_β40 y el A_β42, así como su método de preparación mediante la inmunización de conejos con péptidos de SEC ID Nº 1, 2, 3 ó 4.

Empleo de estos anticuerpos en la valoración tanto de fármacos activadores de la degradación de los péptidos amiloideos característicos de la enfermedad de Alzheimer como de fármacos inhibidores de su formación.

ES 2 201 929 A1

DESCRIPCIÓN

Anticuerpos policlonales, método de preparación y uso de los mismos.

La presente invención se refiere a anticuerpos policlonales que reconocen específicamente y con gran afinidad a los dos péptidos amiloideos más importantes, el $\text{A}\beta 40$ y el $\text{A}\beta 42$, así como a su empleo en la valoración tanto de fármacos activadores de la degradación de los péptidos amiloideos característicos de la enfermedad de Alzheimer como de fármacos inhibidores de su formación. Del mismo modo, pueden ser útiles para la valoración de la actividad de las enzimas implicadas en el procesamiento de la proteína precursora de los citados péptidos o la actividad de las enzimas implicadas en la degradación de los mismos, así como de la valoración del nivel de expresión de los genes implicados en toda la maquinaria de eventos que conducen al depósito y formación de placas amiloideas, lesiones características de los cerebros de pacientes que sufren la enfermedad de Alzheimer.

Estado de la técnica anterior

Se conocen determinados factores acerca de los fenómenos bioquímicos y metabólicos asociados a la presencia de la enfermedad de Alzheimer. Dos cambios morfológicos e histopatológicos observados en cerebros de pacientes con la enfermedad de Alzheimer son marañas neurofibrilares (MNF) y depósitos amiloideos.

Las marañas neurofibrilares intraneuronales están también presentes en otras enfermedades degenerativas, pero la presencia de depósitos de amiloide tanto en los espacios interneuronales (placas neuríticas) como en la microvasculatura circundante (placas vasculares) parece ser característica del Alzheimer. De éstas, las placas neuríticas parecen ser las más características (Price, D.L. y col., Drug Development Research (1985) 5:59-68).

El componente principal de estas placas amiloideas es un péptido de 40-42 aminoácidos denominado péptido amiloide $\text{A}\beta 4$.

El péptido amiloide $\text{A}\beta 4$ es un polipéptido originado por proteólisis a partir de unas glucoproteínas de membrana denominadas proteínas precursoras del péptido amiloide $\text{A}\beta 4$ (β APP). Estando estas proteínas precursoras del péptido amiloide constituidas por 695 a 770 aminoácidos, siendo todas ellas producidas por el mismo gen.

Se han identificado dos variantes principales del péptido amiloide $\text{A}\beta 4$, el péptido $\text{A}\beta 40$ y el $\text{A}\beta 42$, de 40 y 42 aminoácidos respectivamente, que presentan una distribución tisular diferente en condiciones tanto fisiológicas como patológicas.

Nosotros hemos clonado y secuenciado el gen de la β APP en el pollo y hemos demostrado que es prácticamente idéntico al gen humano, pues produce β APPs con una enorme homología, del orden del 95%, a las de la especie humana, y el péptido $\text{A}\beta 4$, característico de la enfermedad de Alzheimer, es idéntico al humano. Además, el embrión de pollo procesa a las β APPs de tal forma que se produce péptido $\text{A}\beta 4$, debido a la acción de unas enzimas proteolíticas que provocan la proteólisis de las β APPs en un sitio clave para producir $\text{A}\beta 4$, la enzima proteolítica que corta las β APPs para producir $\text{A}\beta 4$ es denominada β -secretasa.

Explicación de la invención

La presente invención proporciona anticuerpos policlonales, capaces de reconocer específicamente

mediante cualquier técnica inmunológica convencional (western blot, inmunohistoquímica, inmunoprecipitación, ELISA, RIA, ...) de la presencia de los péptidos amiloideos $\text{A}\beta 40$ y $\text{A}\beta 42$, obtenidos por inmunización de mamíferos, preferiblemente conejos, con una proteína conjugada con un péptido seleccionado a partir de un grupo que consiste en SEQ ID NO 1, SEQ ID NO 2, SEQ ID NO 3, SEQ ID NO 4, opcionalmente acortados por eliminación de los restos de aminoácido de los extremos N-terminal y/o C-terminal, y opcionalmente alargados por adición de los restos de aminoácido apropiados para conjugar la proteína.

En una realización particular, el péptido corresponde a SEQ ID NO 1, opcionalmente alargado por adición de los restos de aminoácido apropiados para conjugar la proteína. En otra realización particular el péptido corresponde a SEQ ID NO 2, opcionalmente alargado por adición de los restos de aminoácido apropiados para conjugar la proteína. En otra realización particular el péptido corresponde a SEQ ID NO 3, opcionalmente alargado por adición de los restos de aminoácido apropiados para conjugar la proteína. En otra realización particular el péptido corresponde a SEQ ID NO 4, opcionalmente alargado por adición de los restos de aminoácido apropiados para conjugar la proteína. Aunque la eliminación de los restos aminoácídicos terminales no elimina la actividad específica, los péptidos preferidos son los de SEQ ID NO 1, SEQ ID NO 2, SEQ ID NO 3 y SEQ ID NO 4.

La provisión de cualquiera de los péptidos,实质上 puros, antes mencionados es también parte de la presente invención.

Esta invención también proporciona un método para la obtención de los anticuerpos policlonales antes mencionados por inmunización de mamíferos, preferiblemente conejos, con una proteína conjugada a un péptido seleccionado a partir de un grupo que consiste en SEQ ID NO 1, SEQ ID NO 2, SEQ ID NO 3, SEQ ID NO 4, opcionalmente acortados por eliminación de los restos de aminoácido de los extremos N-terminal y/o C-terminal, y opcionalmente alargados por adición de los restos de aminoácido apropiados para conjugar la proteína.

Según una forma de realización preferida de realización de la presente invención, la proteína utilizada para su conjugación con el péptido es la hemocianina de lapa (KLH, Keyhole Limpet Hemocyanin en inglés).

En una realización aún más preferida de la presente invención, los mamíferos utilizados, para su inmunización con la proteína conjugada al péptido, son conejos.

De acuerdo con un aspecto de la presente invención, se proporciona un nuevo método para la valoración tanto de fármacos activadores de la degradación de los péptidos amiloideos característicos de la enfermedad de Alzheimer, como de fármacos inhibidores de su producción, mediante el uso de los anticuerpos policlonales descritos anteriormente.

Del mismo modo, el método sirve también para valorar la actividad de las enzimas (proteasas) implicadas en el procesamiento de la proteína precursora de los citados péptidos o la actividad de las enzimas implicadas en la degradación de los mismos.

Esta invención también proporciona un método para la detección de la presencia o ausencia de los péptidos amiloideos $\text{A}\beta 40$ y $\text{A}\beta 42$ en una muestra, empleando el embrión del pollo o cualquiera de las mem-

membranas o líquidos extraembrionarios del huevo embrionado del pollo, como modelo animal de ensayo.

Según una realización preferida de la presente invención, se proporciona un nuevo método para la valoración tanto de fármacos activadores de la degradación de los péptidos amiloideos característicos de la enfermedad de Alzheimer, como de fármacos inhibidores de su producción, mediante el uso del embrión del pollo o cualquiera de las membranas o líquidos extraembrionarios del huevo embrionado del pollo, como modelo animal de ensayo.

De acuerdo con otra realización preferida de la presente invención, se proporciona un nuevo método para valorar la actividad de las enzimas (proteasas) implicadas en el procesamiento de la proteína precursora de los citados péptidos o la actividad de las enzimas implicadas en la degradación de los mismos, mediante el uso del embrión del pollo o cualquiera de las membranas o líquidos extraembrionarios del huevo embrionado del pollo, como modelo animal de ensayo.

El método consiste en la inoculación del fármaco en el huevo embrionado del pollo, ya por simple goteo sobre el propio embrión o alguna de sus membranas, ya por inyección en el vitelino (si el embrión es joven) o saco vitelino (si el embrión es más mayor), en el saco amniótico, en el saco alantoideo (en embriones de más de 6 días de incubación) o en el interior del propio embrión y, tras el tiempo adecuado de incubación, se extrae el embrión y/o cualquiera de las membranas o líquidos extraembrionarios y se analiza la cantidad de péptidos amiloideos, característicos de la enfermedad de Alzheimer, mediante las técnicas convencionales de laboratorio para la cuantificación de péptidos y proteínas como western blot, inmunohistoquímica, inmunoprecipitación, ELISA, RIA, HPLC, etc.

Ejemplos

La presente invención se ilustra mediante los siguientes ejemplos.

Ejemplo 1

Acoplamiento de los péptidos a hemocianina de lapa (KLH, Keyhole Limpet Hemocyanin)

Los péptidos fueron acoplados a la proteína hemocianina de lapa (KLH, Keyhole Limpet Hemocyanin), vía n-terminus, utilizando el agente acoplante glutaraldehído. Para lo cual se activó la proteína KLH en solución de buffer borato pH 10. A continuación se añadió el péptido sintético y lentamente se añadió la salución de glutaraldehído 0.3% mientras se agitaba a temperatura ambiente. Tras la adición de glicina 1M para bloquear el glutaraldehído no reaccionante, se dializó el conjugado péptido-proteína frente a 3 litros de buffer borato pH 8.5 a temperatura de 4°C. El conjugado péptido-KLH se almacenó a 4°C.

Ejemplo 2

Generación de los anticuerpos policlonales

Los cuatro anticuerpos policlonales fueron generados por inmunización de conejos New Zealand White contra los cuatro péptidos acoplados a KLH que se utilizaron como inmunógeno.

Cada inmunógeno se inyectó en dos conejos, realizándose cinco inyecciones: la primera inyección intradérmica del conjugado péptido-KLH en PBS y emulsionados en adyuvante completo de Freund y cuatro más intramusculares, a modo de dosis de recuerdo en los días 14, 28, 49 y 80, del mismo conjugado péptido-KLH en PBS pero esta vez emulsionados en adyuvante incompleto de Freund, realizándose

la sangría de control a los 90 días para detectar la presencia de los anticuerpos.

Ejemplo 3

Purificación de los anticuerpos por afinidad

Tras la recogida de sangre, se separó el suero y se preparó mediante desalado y posteriormente se purificaron los anticuerpos por afinidad en una matriz compuesta por 1,5 ml de material EMD-Epoxy activated (Merck) a la que se añadió 5mg del correspondiente péptido. Las fracciones purificadas se estabilizaron en 0.1% de BSA (Sigma) y se conservaron a 4°C, pudiéndose añadir glicerol 20-50% como crioprotector.

Ejemplo 4

Titulación del anticuerpo por ELISA

Tras la purificación por afinidad se determinó el título del anticuerpo por ELISA. Para ello se puso el antígeno en una placa ELISA Maxi Sorb de Nunc a razón de 50ng/50μl en PBS pH 7, y se detectó el anticuerpo con anti-IgG de burro conjugada con fosfatasa alcalina, utilizando como substrato p-nitrofenil fosfato (PNPP) en dietanolamina con 5mM MgCl₂, pH 9.6 y revelado a las 2 horas.

En conclusión, los anticuerpos se generaron empleando los diferentes péptidos sintéticos descritos anteriormente acoplados a KLH. Estos péptidos sintéticos contienen un número muy pequeño de aminoácidos, lo cual les hace muy adecuados para la producción en cadena de anticuerpos homogéneos, con epítopos predefinidos.

Lista de secuencias

SEQ ID NO 1 LVFFAEDV

SEQ ID NO 2 GLMVGGVV

SEQ ID NO 3 GLMVGGVVIA

SEQ ID NO 4 RHDSGYEVHHQK

En esta solicitud los aminoácidos se abrevian utilizando los códigos de una letra aceptados en el campo, en la forma que se muestra a continuación:

A= Ala= alanina,

C= Cys= cisteína,

D= Asp= ácido aspártico,

E= Glu= ácido glutámico,

F= Phe= fenilalanina,

G= Gly= glicina,

H= His= histidina,

I= Ile= isoleucina,

K= Lys= lisina,

L= Leu= leucina,

M= Met= metionina,

N= Asn= asparagina,

P= Pro= prolina

Q= Gln= glutamina,

R= Arg= arginina,

S= Ser= serina,

T= Thr= treonina,

V= Val= valina,

W= Trp= triptofano,

Y= Tyr= tirosina,

La información relativa a la identificación de las secuencias peptídicas, descritas en la presente invención, que se acompaña a la presente memoria en formato legible por ordenador, es idéntica al listado de secuencias que se presenta acompañando a la memoria.

NUMERO DE SECUENCIAS: 4

INFORMACIÓN SOBRE LA SECUENCIA 1:

CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

LONGITUD: 8

TIPO: aminoácido

TIPO DE MOLÉCULA: péptido

FUENTE: Síntesis Química

DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA:

SEQ ID NO 1

Leu Val Phe Phe Ala Glu Asp Val
1 5

INFORMACIÓN SOBRE LA SECUENCIA 2:

CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

LONGITUD: 8

TIPO: aminoácido

TIPO DE MOLÉCULA: péptido

FUENTE: Síntesis Química

5

DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA:

SEQ ID NO 2

Gly Leu Met Val Gly Gly Val Val
1 5

INFORMACIÓN SOBRE LA SECUENCIA 3:

CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

LONGITUD: 10

TIPO: aminoácido

TIPO DE MOLÉCULA: péptido

FUENTE: Síntesis Química

10

DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA:

SEQ ID NO 3

Gly Leu Met Val Gly Gly Val Val Ile Ala
1 5 10

INFORMACIÓN SOBRE LA SECUENCIA 4:

CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

LONGITUD: 12

TIPO: aminoácido

TIPO DE MOLÉCULA: péptido

FUENTE: Síntesis Química

15

DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA:

SEQ ID NO 4

Arg His Asp Ser Gly Tyr Glu Val His His Gln Lys
1 5 10

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

1. Anticuerpo policlonal para el reconocimiento específico de las formas principales de péptido beta amiloide, $\text{A}\beta 40$ y $\text{A}\beta 42$, obtenible por inmunización de mamíferos con una proteína conjugada a un péptido seleccionado entre el grupo formado por:

- el péptido de SEQ ID NO 1, el péptido de SEQ ID NO 2, el péptido de SEQ ID NO 3, el péptido de SEQ ID NO 4;
- los péptidos con una secuencia resultante de eliminar los restos de aminoácido N-terminal y/o C-terminal de SEQ ID NO 1, de SEQ ID NO 2, de SEQ ID NO 3 o de SEQ ID NO 4;
- y los péptidos resultantes de añadir a cualquiera de las secuencias precedentes, los restos de aminoácido necesarios para la conjugación de la proteína.

2. Anticuerpo policlonal según la reivindicación 1, caracterizado porque la inmunización se realiza con un péptido seleccionado entre el grupo constituido por:

- el péptido de SEQ ID NO 1;
- los péptidos con una secuencia resultante de eliminar los restos de aminoácido N-terminal y/o C-terminal de SEQ ID NO 1;
- y los péptidos resultantes de añadir a cualquiera de las secuencias precedentes, los restos de aminoácido necesarios para la conjugación de la proteína.

3. Anticuerpo policlonal según la reivindicación 1, caracterizado porque la inmunización se realiza con un péptido seleccionado entre el grupo constituido por:

- el péptido de SEQ ID NO 2;
- los péptidos con una secuencia resultante de eliminar los restos de aminoácido N-terminal y/o C-terminal de SEQ ID NO 2;
- y los péptidos resultantes de añadir a cualquiera de las secuencias precedentes, los restos de aminoácido necesarios para la conjugación de la proteína.

4. Anticuerpo policlonal según la reivindicación 1, caracterizado porque la inmunización se realiza con un péptido seleccionado entre el grupo constituido por:

- el péptido de SEQ ID NO 3;
- los péptidos con una secuencia resultante de eliminar los restos de aminoácido N-terminal y/o C-terminal de SEQ ID NO 3;
- y los péptidos resultantes de añadir a cualquiera de las secuencias precedentes, los restos de aminoácido necesarios para la conjugación de la proteína.

5. Anticuerpo policlonal según la reivindicación 1, caracterizado porque la inmunización se realiza con un péptido seleccionado entre el grupo constituido por:

- el péptido de SEQ ID NO 4;

- los péptidos con una secuencia resultante de eliminar los restos de aminoácido N-terminal y/o C-terminal de SEQ ID NO 4;

5 - y los péptidos resultantes de añadir a cualquiera de las secuencias precedentes, los restos de aminoácido necesarios para la conjugación de la proteína.

6. Anticuerpo policlonal según cualquiera de las reivindicaciones anteriores 1 a 5, caracterizado porque la proteína es la hemocianina de lapa (KLH, Keyhole Limpet Hemocyanin en inglés).

7. Anticuerpo policlonal según cualquiera de las reivindicaciones anteriores 1 a 6, caracterizado porque los mamíferos son conejos.

8. Péptido sustancialmente puro caracterizado por tener una secuencia de aminoácidos seleccionada entre el grupo definido en la reivindicación 1.

9. Péptido según la reivindicación 8, caracterizado porque la secuencia se seleccionado entre el grupo definido en la reivindicación 2.

10. Péptido según la reivindicación 9, caracterizado porque la secuencia es SEQ ID NO 1.

11. Péptido según la reivindicación 8, caracterizado porque la secuencia se selecciona entre el grupo definido en la reivindicación 3.

12. Péptido según la reivindicación 11, caracterizado porque la secuencia es SEQ ID NO 2.

13. Péptido según la reivindicación 8, caracterizado porque la secuencia se selecciona entre el grupo definido en la reivindicación 4.

14. Péptido según la reivindicación 13, caracterizado porque la secuencia es SEQ ID NO 3.

15. Péptido según la reivindicación 8, caracterizado porque la secuencia se selecciona entre el grupo definido en la reivindicación 5.

16. Péptido según la reivindicación 15, caracterizado porque la secuencia es SEQ ID NO 4.

17. Uso de un péptido según cualquiera de las reivindicaciones anteriores 8 a 16, para la obtención de anticuerpos policlonales mediante conjugación a una proteína e inmunización de mamíferos.

18. Uso según la reivindicación 17, caracterizado porque la proteína es la hemocianina de lapa (KLH, Keyhole Limpet Hemocyanin en inglés).

19. Uso según cualquiera de las reivindicaciones anteriores 17 a 18, caracterizado porque los mamíferos son conejos.

20. Método de obtención anticuerpos policlonales para el reconocimiento específico de las formas principales de péptido beta amiloide, $\text{A}\beta 40$ y $\text{A}\beta 42$, caracterizado porque se inmunizan mamíferos con una proteína conjugada a un péptido seleccionado entre el grupo definido en la reivindicación 1.

21. Método según la reivindicación 20, caracterizado porque la proteína utilizada es la hemocianina de lapa (KLH, Keyhole Limpet Hemocyanin en inglés).

22. Método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores 20 a 21, caracterizado porque los mamíferos son conejos.

23. Método de detección de la presencia o ausencia de los péptidos amiloides $\text{A}\beta 40$ y $\text{A}\beta 42$ en una muestra, caracterizado porque comprende poner en contacto dicha muestra con un anticuerpo definido como en la reivindicación 1, y detectar la presencia o ausencia del complejo formado por dichos péptidos amiloides y dicho anticuerpo.

24. Método de valoración tanto de fármacos activadores de la degradación de los péptidos amiloides, como de fármacos inhibidores de su producción, mediante el uso de los anticuerpos policlonales descritos en la reivindicación 1, **caracterizado porque se emplea el huevo embrionado del pollo como modelo animal de ensayo.**

25. Uso del huevo embrionado de pollo como modelo animal de ensayo para la valoración tanto de fár-

macos activadores de la degradación de los péptidos amiloides, como de fármacos inhibidores de su producción, mediante el empleo de anticuerpos policlonales como marcadores de la presencia ausencia de dichos péptidos amiloides.

26. Uso según la reivindicación 25, **caracterizado porque los anticuerpos policlonales utilizados son los definidos en la reivindicación 1.**

5
10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

LISTAS DE SECUENCIAS



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS
ESPAÑA

(11) ES 2 201 929
(21) Nº de solicitud: 200202094
(22) Fecha de presentación de la solicitud: 12.09.2002
(51) Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

(51) Int. Cl.7: C07K 16/18, 7/06, 7/08, G01N 33/68

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	WO 8906242 A1 (THE MCLEAN HOSPITAL CORPORATION & UNIVERSITY OF ROCHESTER) 13.07.1989, todo el documento.	1,2,5-10, 15-23 24-26
Y	DOMÍNGUEZ, L.; GARZA, V.; LACOSTA, A.M.; SORRIBAS, V.; SARASA, M. Developmental spatiotemporal expression of Alzheimer beta-APP isoforms in the chick embryo. Int. J. Dev. Biol., 2001, Vol. 45 (S1), páginas S73-S74.	24-26
X	CITRON, M.; DIEHL, T.S.; GORDON, G.; BIERE, A.L.; SEUBERT, P.; SELKOE, D.J. Evidence that the 42- and 40-amino acid forms of amyloid beta protein are generated from the beta-amyloid precursor protein by different protease activities. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. Noviembre 1996, Vol. 93, páginas 13170-13175.	1,3,4,8, 11-14,17, 20,23

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del Informe 28.11.2003	Examinador E. Relaño Reyes	Página 1/1
--	-------------------------------	---------------